

03062
15
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION Y REGULACION DE LA XANTINA DESHIDROGENASA DE NODULOS
DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADOS CON *Rhizobium tropici* CEPA CIAT 899
Y SU SIGNIFICADO EN LA SIMBIOSIS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA: LUCIA SOTO URZUA.

1994.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La xantina deshidrogenasa de nódulo y raíz de *Phaseolus vulgaris*, se purificarón a homogeneidad. La purificación se llevó a cabo por fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un rango del 25 al 40% de saturación, calentamiento a 68 C, cromatografía de filtración molecular sobre Sephacryl S-300 y por cromatografía de afinidad en Blue Sepharosa 6-Cl. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes. Se prepararon anticuerpos policlonales contra la xantina deshidrogenasa purificada de nódulos, para realizar ensayos de inmunotitulación e inmunodetección (western blot), para determinar si ésta enzima es una proteína nódulo específica. Estos ensayos mostraron algunas diferencias entre la xantina deshidrogenasa presente en extractos de nódulo y raíz. El estudio de actividad de XDH a diferentes pHs utilizando un rango de 4-10, mostraron un pH óptimo de 9 para la XDH de nódulo y de pH 9 y 7 para la XDH de raíz; estos resultados nos sugieren diferencias funcionales en ambas enzimas. Los análisis electroforéticos en condiciones desnaturalizantes, mostraron que la xantina deshidrogenasa de nódulo, como la de raíz, está compuesta, de dos subunidades de 142 y 128 kD.

CARACTERIZACION Y REGULACION DE LA XANTINA DESHIDROGENASA DE NODULOS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADOS CON *Rhizobium tropici* cepa CIAT899 Y SU SIGNIFICADO EN LA SIMBIOSIS.

INTRODUCCION.

ASPECTOS GENERALES DE LA SIMBIOSIS.

La fijación simbiótica del nitrógeno resulta de la interacción entre la planta hospedera y el microorganismo huésped. La planta hospedera provee al microorganismo, la fuente de energía y un nicho ecológico especializado para su crecimiento y función. El microorganismo fija nitrógeno atmosférico y provee a la planta nitrógeno reducido. La interacción *Rhizobium*-leguminosa es una simbiosis típica, la fijación simbiótica del nitrógeno ocurre también en no leguminosas, tales como la familia Eleagnaceae en asociación con Actinomiceto *Frankia* y entre el helecho *Azolla* y cianobacterias. El nicho ecológico para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa son los nódulos en la raíz generados de su interacción, estos son órganos altamente organizados, que resultan de tejido hiperplásico de las células corticales de la raíz (58,59). Los nódulos se dividen en dos grupos por su forma, actividad meristemática y transporte de productos del nitrógeno fijado: 1.- nódulos cilíndricos elongados con actividad meristemática apical indeterminada transportan el nitrógeno fijado en forma de amidas por ejemplo alfalfa (*Medicago sativa*), chícharo (*Pisum sativum* L.) y trébol (*Trifolium*); y 2.- Nódulos esféricos con actividad meristemática interna determinada, transportan el nitrógeno fijado como ureidos tales como soya (*Glycine max* Nerr.) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). Una serie de eventos complejos se llevan a cabo desde la colonización bacteriana en la rizosfera, la fijación de nitrógeno y el transporte del nitrógeno asimilado; requieren de la expresión coordinada de genes bacterianos y de la planta hospedera. Los genes involucrados en la simbiosis pueden ser agrupados de acuerdo a varias funciones: reconocimiento, invasión del pelo radicular, formación del hilo de infección, desarrollo y diferenciación del nódulo, asimilación del carbono, metabolismo de ácidos orgánicos, fijación de nitrógeno, asimilación del amonio y posiblemente supresión de la respuesta de defensa de la planta hospedera (58).

Una función de vital importancia en la simbiosis realizada por la bacteria es la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) para producir amonio el cuál es asimilado por la planta. Este proceso tiene un alto requerimiento de energía que a su vez es generado por la planta.

Algunos investigadores basándose en estudios in vitro de los requerimientos de ATP para la reducción de dinitrógeno (57) han sugerido que la disponibilidad del carbono reducido fotosintéticamente es el principal factor limitante de la fijación simbiótica de nitrógeno.

Los estudios realizados establecen que del 15 al 30% del fotosintato neto de una planta se requieren para llevar a cabo la reducción de nitrógeno y la asimilación de amonio dentro del nódulo. Durante la simbiosis parte del fotosintato es utilizado para la producción de energía en forma de ATP y NADH en el bacterioide para la reducción de nitrógeno; sin embargo, más de la mitad del fotosintato derivado al nódulo, es utilizado en la asimilación y transporte del nitrógeno recientemente fijado (57,63).

Una vía metabólica detallada que una fijación de nitrógeno y producción de ureidos en nódulos de raíces leguminosas no se ha establecido; sin embargo la presencia de ureidos marcados con ^{15}N en plantas como resultado de la fijación del gas N_2 en plantas intactas de garbanzo y soya, establece que durante la simbiosis, los ureidos son sintetizados a partir del amonio fijado en la bacteria y asimilado en la célula vegetal. Hay un acuerdo general de que amonio es el primer producto estable de la fijación de nitrógeno en nódulos, el cuál es liberado de los bacteroides y su asimilación se lleva a cabo en el citoplasma de las células infectadas.

En el proceso simbiótico, el N_2 fijado por la bacteria es transferido al citoplasma de la célula vegetal en forma de NH_4 . Los estudios con ^{15}N demuestran que el NH_4 es asimilado en glutamina y ácido glutámico por la vía GS-GOGAT. En plantas noduladas que transportan ureidos, el nitrógeno de glutamina es incorporado en el anillo de purinas cuya oxidación produce ac. alantóico y alantofina que son transportados hacia las partes aéreas de la planta donde son metabolizados (1,8,22,33).

Transporte de nitrógeno en la simbiosis.

Las especies que utilizan ureidos (alantofna y ácido alantofco) como producto principal de la exportación del nitrógeno fijado, pertenecen a la tribu Phaseolae. Alantofna y ácido alantofco tienen relativamente baja solubilidad comparadas con las midas asparagina y glutamina; esto puede considerarse benéfico debido a que los ureidos son una forma conveniente de almacen de nitrógeno, pero pueden tener sus desventajas si la baja solubilidad limita la translocación de nitrógeno y por lo tanto afecta la producción de grano (1,2,63).

La composición del xilema puede variar dependiendo de las condiciones ambientales, edad de la planta y fuentes disponibles de nitrógeno (59). Existen diferencias en la cantidad de fotosintato requerido para la generación de energía y esqueletos de carbono usados en la síntesis de diferentes compuestos nitrogenados; estas diferencias pueden afectar la eficiencia de asimilación y transporte de amonio. En base a los requerimientos de esqueletos de carbono, para transportar nitrógeno, los ureidos tienen una relación C:N de 1 comparado con una relación C:N de 2.1 de amidas lo que puede reducir el costo de carbono para el transporte de amonio (1).

Los compuestos nitrogenados principales, en la savia del xilema de un gran número de plantas son las amidas: glutamina y asparagina una de las razones sugeridas para la predominancia de estos dos compuestos es su relativa baja relación (C:N 2:1) lo que eficientiza el transporte de N en términos de costo de C (1,18,44). Esto permite asumir que las plantas noduladas las cuales utilizan ureidos como forma principal de transporte de nitrógeno (C:N 1:1) tienen una mayor eficiencia en términos de consumo de C lo cuál adquiere mayor relevancia dado el alto costo de energía de la simbiosis. En experimentos realizados en garbanzo (planta productora de ureidos), son efectivamente más eficientes en la utilización del C comparados con los nódulos de plantas productoras de amidas (44,51). Muchas de las leguminosas que tienen altos requerimientos de nitrógeno para la producción de semillas por gramo de fotosintato disponible, también usan ureidos como principales formas de transporte de nitrógeno (Ejm. soya, garbanzo y frijol), sugiriendo tal vez que los ureidos en plantas sean particularmente importantes en la conservación del carbono.

Biosíntesis de ureidos

En general las plantas presentan diferentes estrategias para el transporte de nitrógeno asimilado. Las amidas asparagina y glutamina son las formas predominantes de nitrógeno orgánico en exudados del xilema de muchas plantas fijadoras de nitrógeno incluyendo chícharo, lupinus, myrica y en plantas fertilizadas con nitrógeno inorgánico. El ureido citrulina predomina en las no leguminosas fijadoras de nitrógeno (1,8) y los ureidos alantoína y ácido alantoico son las principales formas de nitrógeno orgánico exportado de nódulos de leguminosas tropicales como soya, garbanzos y frijol (1,55,57). Existen dos posibles vías para la biosíntesis de ureidos: la primera involucra urea y dos fragmentos de glioxilato y la segunda involucra el catabolismo oxidativo de purinas. La presencia en nódulos de las enzimas del catabolismo de purinas (xantina deshidrogenasa, uricase y alantoinasa), junto a otros resultados de estudios con inhibidores apoyan la presencia de esta última vía en la simbiosis. La presencia de los ureidos alantoína y ácido alantoico en plantas leguminosas se conocen desde hace más de la mitad de la centuria. Durante los últimos cinco años estos compuestos se han involucrado en el transporte de nitrógeno. Un avance en el reanálisis del metabolismo de ureidos fué proporcionado por Matsumoto y col.. 1976 (30) al encontrar que en experimentos hechos con ^{15}N alantoína, ésta sólo se acumula en tallos y raíces de plantas noduladas. El patrón de marcaje apoyó fuertemente hacia la síntesis de alantoína y ácido alantoico en nódulos y su subsecuente transporte por el xilema hacia las partes aéreas de la planta. Además se demostró que la adición de compuestos nitrogenados exógenos disminuye las concentraciones de alantoína en el tejido, en forma paralela a la inhibición de la formación del nódulo (2). La proporción de nitrógeno como ureidos en el xilema de soya varía de un 78% en plantas noduladas dependientes de la fijación de nitrógeno, a un 6% en plantas alimentadas con 20 mM de nitrato (21,22). En trabajos realizados con plantas crecidas en presencia o ausencia de nitrato, y en presencia de acetileno como inhibidor de la fijación de nitrógeno se demostró que el contenido de ureidos del xilema en diferentes cultivares de soya, se relacionan directamente con la actividad de fijación de nitrógeno. La acumulación de altas cantidades de ureidos en plántulas jóvenes sugieren que estos pueden no ser totalmente dependientes de la fijación de nitrógeno y que resulten de la oxidación de purinas provenientes de la degradación del RNA almacenado en cotiledones (22). No todas las leguminosas sintetizan grandes cantidades de ureidos en sus nódulos (clavel, alfalfa y lupinus). Las que sintetizan grandes cantidades incluyen un número de leguminosas económicamente importantes tales como frijol, haba y soya.

Vías de síntesis de ureidos

La primera evidencia real de la biogénesis de ureidos en nódulos de soya como resultado de la degradación de purinas se obtuvo utilizando alopurinol el cuál es un inhibidor específico de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH). Las plantas de soya expuestas a este inhibidor mostraron una disminución significativa en la cantidad de ureidos en tallos y nódulos. Otra evidencia directa de que las purinas dan lugar a ureidos fue obtenida cuando se demostró que glicina marcada con ^{14}C en cortes de garbanzo es incorporada en ureidos más rápidamente que glicosil acetato. Estos hallazgos son apoyados por la presencia de la enzima glicinamida nucleótido sintetasa presente en la biogénesis de purinas. CO_2 marcado fue incorporado en nódulos de plantas de soya en la posición C_6 de xantina el cuál se acumuló en plantas tratadas con alopurinol. Estudios de concentraciones enzimáticas durante el desarrollo del nódulo han mostrado que la fosforibosil amidotransferasa la cuál cataliza la primera etapa de la biosíntesis de purinas, se incrementa durante el inicio de la fijación de nitrógeno. Un aumento similar se ha detectado en los niveles de fosforibosil pirofosfato sintetasa (PRPP), la cuál cataliza la síntesis de fosforibosil pirofosfato utilizada en la biosíntesis de purinas. En estos estudios se observaron incrementos similares en los niveles de enzimas que oxidan purinas, la magnitud de los incrementos observados fueron apoyados con el aumento en la biosíntesis de purinas endógenas y la introducción de un grupo específico de enzimas para la oxidación de purinas a alantoina y ácido alantoinico. Los datos anteriores demuestran que los ureidos sintetizados en nódulos, derivan de la síntesis de novo de purinas. Fig (A)

Las concentraciones de enzimas de nódulo involucradas en la biosíntesis y oxidación de purinas han sido comparadas entre soya, frijol pinto (ambas sintetizan ureidos en nódulos) y lupinus el cuál sintetiza amidas; cuando las actividades en cada especie fueron estandarizadas con respecto a la reducción de acetileno (ARA capacidad de fijar nitrógeno de la planta), las concentraciones de las enzimas que oxidan purinas en lupinus fueron insignificantes en comparación con las otras especies. Las actividades de fosforibosil pirofosfato sintetasa y fosforibosil amidotransferasa fueron superiores en plantas transportadoras de ureidos.

Las fuentes de nitrógeno requeridas para la síntesis de novo de purinas se producen rápidamente en los nódulos de especies productoras de ureidos. Sin embargo, las enzimas de la vía IMP las cuales han sido detectadas en extractos de nódulo son la fosforibosil pirofosfato sintetasa PRPP (E.C.2.7.6.1) y la PRPP amidotransferasa (E.C.2.4.2.14). En animales y bacterias el inosin monofosfato (IMP), es un

producto intermediario de la síntesis y la degradación de purinas. Cuando el IMP se agregó a nódulos de garbanzo in vitro, se observó la acumulación de hipoxantina; sin embargo cuando plantas enteras intactas se trataron con alopurinol el intermediario que se acumuló en los nódulos de soja y garbanzo fué xantina como resultado de la síntesis de novo. Ambas actividades oxidativas de xantina deshidrogenasa sobre hipoxantina y xantina son inhibidas por alopurinol. IMP es oxidado por IMP deshidrogenasa a xantosin monofosfato XMP. IMP deshidrogenasa se ha encontrado en semillas de chícharo, pero ninguna traza de actividad en nódulos de garbanzo, si la enzima estuviera activa en estos nódulos después de alimentarse con IMP en presencia de alopurinol debería acumularse xantina, por lo tanto es posible que exista IMP deshidrogenasa en nódulos pero que sea muy susceptible a inactivación (27,43,44,45). La biosíntesis de purinas y por lo tanto de ureidos, requiere de un suplemento constante de precursores. La glutamina y aspartato son rápidamente disponibles en nódulo como resultado de la asimilación de amonio vía glutamino sintetasa, glutamato sintetasa y aspartato aminotransferasa, una vía común tanto en plantas que sintetizan amidas como ureidos. Sin embargo el suplemento de glicina y C (metilen formil-FH) como intermediarios son requerimientos especiales de nódulos productores de ureidos. Los estudios comparativos de los patrones de aparición enzimática durante el desarrollo de nódulo de lupinus y nódulos productores de ureidos, indican una correlación directa entre la producción de ureidos y niveles incrementados de fosfoglicerato deshidrogenasa, serina hidroximetilasa y metilen-FH4 deshidrogenasa. Estos resultados sugieren una vía que involucra la biosíntesis de serina, seguido por su rompimiento a través de una hidroximetilasa a glicina y metilen-FH , el cuál es oxidado por la deshidrogenasa a metenil-FH . Las altas concentraciones de fosfoserina, glicina y serina correlacionan con nódulos productores de ureidos cuando se comparan con aquellos nódulos productores de amidas.

Las plantas de soja noduladas contienen grandes cantidades de alantofina y ácido alantofco comparadas con las plantas no noduladas. Cuando la soja es alimentada con fuentes inorgánicas de nitrógeno, se observa una disminución del contenido de alantofina, reducción en el número de nódulos y de la actividad de la fijación de nitrógeno. De igual manera fué demostrado que al incrementar la concentración de nitratos, aplicados a sojas noduladas, se disminuye el contenido de ureidos, nitrógeno del xilema, peso de nódulo por planta y la actividad de fijación de nitrógeno.

NODULO DE SOYA

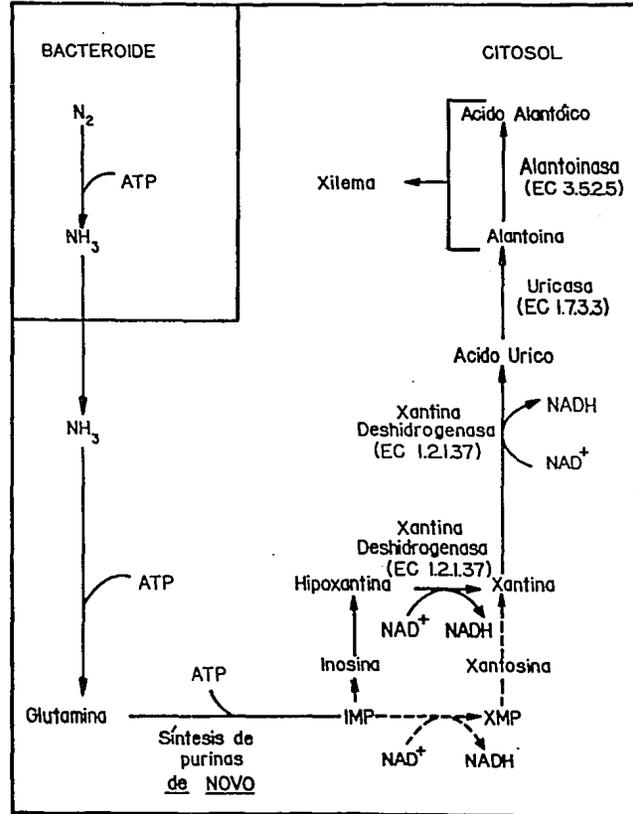
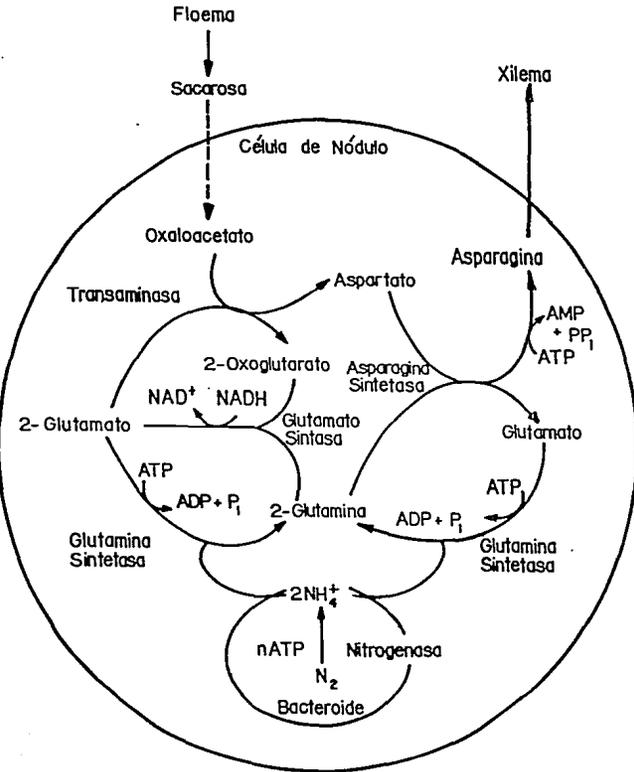


Fig.A Esquema de las vías de síntesis de ureidos y amidas.

En plantas de *Phaseolus* no nodulada, la contribución de ureidos al nitrógeno total en el xilema varía desde 13-42%, dependiendo de la fuente de nitrógeno y la concentración aplicada. En plantas de soya noduladas el 86% del nitrógeno total del xilema fué en forma de alantofina y/o ácido alantofico, mientras que plantas alimentadas con 20mM de nitrato de potasio, los ureidos sólo comprenden el 6% del nitrógeno total en el xilema. De estos resultados se sugiere que las leguminosas tropicales como frijol y soya al ser noduladas por *Rhizobium*, inducen la síntesis de ureidos y el NH_4 derivado de la fijación de nitrógeno, es transportado a las partes aéreas de la planta en forma de alantofina y ácido alantofico. En plantas noduladas de garbanzos existen algunas variaciones en el contenido de ureidos durante el desarrollo, aún cuando los niveles en xilema permanecen altos contribuyendo con el 60 y 80% del nitrógeno total. La incorporación de nitrógeno ^{15}N al sistema de raíces de las plantas noduladas resulta en un rápido marcaje de ureidos en nódulos, savia del xilema y otros órganos tanto en soya como en garbanzo. Similarmente alantofina y ácido alantofico son rápidamente marcados con ^{15}N en nódulos cosechados de especies de plantas formadoras de ureidos. Las altas concentraciones de ureidos en el xilema están asociadas con una nodulación efectiva y directamente relacionadas con la fijación de nitrógeno. Los ureidos se han encontrado en semillas o plántulas jóvenes de muchas especies. Los niveles de alantofina pueden incrementar marcadamente de manera paralela a la germinación; en este último caso la hidrólisis del RNA de almacén en cotiledones y la consecuente liberación de bases púricas son la vía de producción de ureidos. Estos ureidos transportadores de nitrógeno al ser metabolizados proporcionan el nitrógeno para la síntesis de proteínas en etapas tempranas de desarrollo (57).

ANTECEDENTES:

Xantina deshidrogenasa (XDH EC 1.2.1.37), ésta enzima ocupa una posición clave en el metabolismo de purinas, cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina en la vía de síntesis de ureidos en nódulos de leguminosas. La enzima fué inicialmente descubierta en leche; parece estar ampliamente distribuida en animales, microorganismos y plantas. La degradación de purinas en varios microorganismos es total y resulta en la producción de amonio(61). En animales, el catabolismo de purinas puede ser más o menos dependiendo de las especies. En plantas, la presencia de productos del catabolismo de purinas ha sido reconocidos; alantofina fué aislado de brotes de *Platanus orientalis* y ácido alantóico de vainas de *Phaseolus*, ambos productos representan los principales compuestos nitrogenados en ciertas familias de plantas (32). En plantas superiores se han demostrado tres enzimas involucradas en el catabolismo de purinas: alantofinasa (EC.3.5.2.5), uricasa (EC.1.7.3.3) se reportaron en semillas de leguminosas y pocos años después alantóicasa EC.3.5.3.4) fué encontrada en *Glycine hispida*.

El metabolismo de purinas, y especialmente las enzimas del catabolismo de purinas han sido poco estudiadas en plantas en comparación con los numerosos reportes en animales y microorganismos. El catabolismo de purinas está involucrado en el metabolismo de nitrógeno en ciertas especies de leguminosas; especialmente en leguminosas tropicales tales como garbanzo (*Vigna unguiculata*) y soya (*Glycine max*). Los ureidos (alantofina y ácido alantóico), representan los principales compuestos derivados de la asimilación de nitrógeno en leguminosas noduladas (18,22,30,33). Su biosíntesis está directamente asociada con el proceso de fijación y asimilación de nitrógeno en nódulos (3,18) y es dependiente de la actividad de XDH.

Presencia de xantina deshidrogenasa en plantas.

La dificultad principal para demostrar la presencia de xantina deshidrogenasa en extractos de plantas se atribuyó primero a la muy baja actividad de la enzima y segundo al cofactor poco usual requerido para la reacción. Los ensayos espectrofotométricos adecuados para medir la actividad enzimática se realizaron siguiendo la oxidación de hipoxantina o xantina en presencia de oxígeno contenido en el medio de reacción. La primera evidencia de actividad de la enzima capaz de oxidar hipoxantina en extractos de plantas se basó en el desarrollo de una técnica de marcaje radiactivo, junto con la identificación del cofactor requerido para

la reacción. Así en extractos de hoja de *Pharbitis nil*, la actividad de xantina deshidrogenasa se caracterizó ser dependiente de NAD^+ (35). Desde entonces la misma enzima se ha encontrado en callos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (35), hojas de chícharo (36) y tabaco (38). Se puso atención especial sobre la xantina deshidrogenasa en plantas leguminosas; en soya Tajima y Yamamoto en 1975 reportaron una actividad de xantina oxidasa en extractos de nódulos, pero no en hojas, tallos o raíces (56). Sin embargo en 1980 Triplett y col. en la misma especie, demostraron en extractos de nódulos una XDH dependiente de NAD^+ pero ninguna actividad de xantina oxidasa. Esta enzima se encontró también presente en nódulos de *Phaseolus lunatus* (51), *Phaseolus vulgaris* (9,43), garbanzo (3), *Lupinus angustifolius* 43).

Propiedades catalíticas de la XDH

La xantina deshidrogenasa es semejante a otras molibdo-hidrolasas, por ejemplo xantina oxidasa, aldehído oxidasa y sulfito oxidasa, que catalizan la introducción de un átomo de oxígeno en un sustrato reductor. El oxígeno es derivado del agua y los electrones generados de éste son aceptados por los sustratos oxidados.

Sustratos oxidados

Xantina oxidoreductasa ha sido estudiada de fuentes animales y microbianas. Puede ocurrir en dos formas, una necesita la presencia de oxígeno molecular para llevar a cabo la reacción. Esta es llamada xantina oxidasa (EC.1.2.3.2). Es particularmente abundante en leche de bovinos; otra forma de enzima con pobre actividad en presencia de oxígeno pero con alta actividad en presencia de un aceptor orgánico de electrones, es llamada xantina deshidrogenasa (EC.1.2.1.37). Esta presenta diferencias en especificidad para sustratos oxidantes, utiliza NAD^+ como cofactor en hígado de gallina o ferredoxina en *Micrococcus lactilyticus*. Se esperaba que las formas de xantina oxidasa y deshidrogenasa pudieran ser interconvertidas (7,16,25,50). En plantas superiores, xantina oxidoreductasa ha sido caracterizada como la forma deshidrogenasa; NAD^+ es el aceptor de electrones para la oxidación de hipoxantina y xantina en hojas (35,36,38) y en nódulos de raíces (9,12,37,51,52,53,54). La enzima puede operar en presencia del dinucleótido adenina acetilpiridina un análogo de NAD^+ . Aunque la forma oxidasa ha sido reportada en nódulos de soya (56), ésta no ha podido ser detectada en posteriores investigaciones ni en bacteroides ni en el citosol de nódulo (51). Se ha observado que la xantina deshidrogenasa de planta no se convierte a la forma oxidasa por cualquier rompimiento proteolítico, tratamiento a bajas temperaturas (36) ó por reactivos que modifican los grupos tiol tales como 5,5-ditiobis-2-nitrobenceno (10). Por lo tanto a diferencia de la enzima de mamíferos, la enzima de la planta parece ser más estable en la forma deshidrogenasa como la de aves (24,41). La XDH de planta puede también operar en presencia de otros sustratos oxidantes pero las respuestas parecen ser diferentes dependiendo de la fuente de la enzima. Mientras la enzima de hoja exhibe actividad en presencia de NADP^+ ó de fenazina metasulfato (PMS) pero no en presencia de diclorofenol indofenol (DCIP) (36), la XDH de nódulo no funciona en presencia de NADP^+ ni de PMS pero sí en presencia de DCIP (9). La discriminación entre la XDH de nódulo y hoja a

través del efecto del PMS es incierto, dado que PMS actúa como un aceptor de electrones en ausencia de NAD^+ lo que permite visualizar las bandas de actividad de la XDH sobre geles de poliacrilamida para enzimas de varias fuentes (37,38). En contraste, la diferencia en actividad de XDH para NADP^+ parece más seguro y la ausencia de reactividad hacia éste cofactor también se ha observado en extractos de nódulos de soya.

Sustratos reductores

Las xantinas deshidrogenasas de animales y bacterias catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos tales como varias purinas sustituidas, hipoxantina, xantina, pteridina, NADH, alopurinol. Hay poca información acerca de la especificidad de la enzima de la planta por ésta clase de sustrato. En la mayoría de las investigaciones en plantas, hipoxantina y xantina son ensayados como sustratos reductores. Igual actividad se ha observado con ambos sustratos en lentejas, mientras que la oxidación de hipoxantina a xantina es más rápida que de xantina a ácido úrico en soya (10). En suma NADH es rápidamente oxidado en presencia de DCIP por la XDH de nódulos de *Phaseolus vulgaris* en la misma proporción que hipoxantina.

pH óptimo

Los valores de pH óptimo reportados para xantina deshidrogenasa en varios tejidos de plantas superiores son similares. En extractos libres de células en plántulas de lentejas, xantina oxidasa muestra un pico máximo de actividad a pH 8.0 semejante a la XDH de hoja (35,36), un valor de pH óptimo de 7.9 se ha reportado para XDH en nódulos de garbanzo (63). La XDH purificada de nódulos de soya exhibe un máximo de actividad a pH 7.6 (10). Un pH óptimo de 10.0 se reportó para xantina oxidasa en nódulos de soya (56).

Propiedades cinéticas

La xantina deshidrogenasa se caracteriza por tener una alta afinidad por xantina, hipoxantina y NAD^+ . La actividad de xantina deshidrogenasa es inhibida por productos de la reacción. El ácido úrico 1mM inhibe un 75 % la actividad de la enzima de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, así mismo NADH inhibe la reacción de la enzima de nódulo de soya (9). Se conocen varios compuestos químicos que inhiben la actividad de xantina deshidrogenasa de plantas. Los agentes que se unen a metales tales como cianuro de potasio y ácido salicílico inhiben la actividad de XDH de hojas de chicharo. Sustratos y productos análogos inhiben la actividad de XDH, adenina y guanina inhiben la enzima de nódulos de garbanzo (63); la XDH de nódulos de *Phaseolus vulgaris* es también inhibida por adenina y en menor proporción por NADP^+ (9). Entre los inhibidores más potentes de xantina deshidrogenasa, se encuentran 2-amino-4-hydroxipteridina, purina-6-aldehído y alopurinol, sólo éste último ha sido usado ampliamente en la inhibición de enzimas de plantas. Alopurinol (4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidina) es un inhibidor específico de xantina deshidrogenasa. En hojas de chicharo, el 75% de la actividad de XDH es inhibida por 0.5uM de alopurinol (36), mientras que se necesita 50uM para tener el mismo efecto en la enzima de nódulos de soya (18). En nódulos de garbanzo la XDH es completamente inhibida en presencia de éste inhibidor a 1 uM (3). La enzima de nódulos de *P. vulgaris* es también inactivada por alopurinol pero este efecto es disminuido en presencia de hipoxantina (9).

Propiedades moleculares

Peso molecular y punto isoeléctrico.

La XDH de planta tiene un peso molecular aproximado de 300 kD. La enzima de nódulo tiene un peso molecular aproximado de 285 kD (52) y 325 kD (10), la de hojas de tabaco de 320 kD (38). Estos valores son muy semejantes a aquellos de enzimas en hígado de gallina e hígado de pavo (41,49); un peso molecular superior 357 kD se ha reportado en *N. crassa* y un valor más bajo 224 kD en *Clostridium acidurici*. El punto isoeléctrico de XDH de nódulos de *Glycine max* es de 4.7 (52).

Subunidades

La estructura dimérica parece ser una característica general de las molibdeno-hidrolasas como la XDH. Una subunidad de 150kD se ha reportado de varias fuentes (28,49). La enzima de nódulo de soya está formada por un sólo péptido el cuál tiene un peso molecular de 141 kD (52). En pocos trabajos se han encontrado patrones de diferentes subunidades de 81 y 63 kD en *P. acidovorans* y cinco subunidades con pesos moleculares de 110, 83, 56, 53 y 26 kD en *C. acidurici*.

Grupos prostéticos

Las enzimas xantina deshidrogenasa, xantina oxidasa y aldehído oxidasa pertenecen al grupo llamado molibdo- hierro-azufre flavin hidroxilasas. En la actualidad se ha establecido que todas estas enzimas contienen dos átomos de molibdeno, dos moléculas de FAD y ocho grupos de hierro-azufre por molécula. Los datos concernientes a los grupos prostéticos en XDH de plantas son escasos, ellos muestran que el contenido de molibdeno y hierro en enzimas de plantas se parece a aquellas XDH de otras fuentes. La XDH de nódulos de soya no contiene FAD sino FMN (52), a la fecha es el único caso de una molibdeno hidroxilasa que contiene FMN.

Mecanismos de reacción

Desde el descubrimiento del FAD unido a la enzima xantina oxidasa de leche, el mecanismo catalítico ha sido ampliamente estudiado en orden a determinar el número, la naturaleza de los sitios de reacción y sus papeles respectivos. Aunque el mecanismo es complejo y no es totalmente claro, a la fecha es bien establecido que aquellos sustratos reductores (excepto NADH), interaccionan con el sitio molibdeno mientras los sustratos oxidantes interactúan con el sitio flavin. En resumen, el funcionamiento de los primeros es dependiente de la presencia de un grupo persulfuro en la vecindad del sitio molibdeno y el funcionamiento del último parece ser dependiente del grupo tiol cercano al flavin. Por otro lado este grupo tiol juega un papel crucial decisivo en el funcionamiento oxidasa o deshidrogenasa de la enzima. Su papel ha sido especialmente señalado por medio del estudio de interconversión de la xantina oxidoreductasa en hígado de rata (16,25,50). Este grupo tiol tendría que permanecer intacto para obtener la XDH activa, si este es oxidado la forma deshidrogenasa es convertida en la forma oxidasa y vice versa. También se ha propuesto que este único grupo tiol puede interactuar uniendo NAD^+ a la enzima. A diferencia de la XDH de mamíferos, la XDH de nódulos de soya no parece contener un grupo tiol esencial; por lo que no puede ser convertidos a la forma oxidasa después de tratamiento por reactivos muy específicos modificadores de grupos tiol tales como 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenceno (10). Estos autores proponen que una cadena lateral histidil pudiera estar involucrada en la catálisis, ya que el tratamiento de la XDH de nódulo con dietilpirocarbonato, un reactivo específico de histidina, causa pérdida de la actividad dependiente de NAD^+ .

En la mayoría de los organismos, xantina deshidrogenasa promueve el rompimiento oxidativo de la porción púrica de los ácidos nucleicos y nucleósidos. Hace tiempo la atención se enfocó en la actividad oxidasa actualmente hay evidencias convincentes que la forma deshidrogenasa pueda ser biológicamente la más significativa. Se ha puesto más atención en las propiedades moleculares y catalíticas de xantina deshidrogenasa de fuentes animales y bacterianas que en la función biológica de la enzima. De hecho la xantina deshidrogenasa no parece jugar un papel esencial en *Drosophila*, rata o seres humanos ya que deficiencias genéticas de la enzima o tratamientos inhibitorios de la enzima no parecen afectar la fisiología, crecimiento y reproducción (49). Así mismo en callos de tabaco y en *Chlamydomonas reinhardtii*, el grado de crecimiento de líneas celulares deficientes de XDH no difieren de la línea silvestre (17). Sin embargo, en organismos inferiores la XDH ocupa un papel primario cuando el crecimiento ocurre en medio conteniendo sólo xantina o

hipoxantina como única fuente orgánica tales como *N. crassa* (28). En plantas las enzimas especialmente del catabolismo de purinas se han estudiado poco, se han demostrado estar involucradas en el metabolismo de nitrógeno de ciertas especies de leguminosas. En leguminosas tropicales tales como garbanzo y soya, los ureidos alantofina y ácido alantofico representan los principales productos de la asimilación de nitrógeno en nódulos, su biosíntesis está directamente asociado con el proceso simbiótico de fijación de nitrógeno y es dependiente de la actividad de la XDH (1,18), en contraste con el tejido de hoja, los nódulos de especies de productores de ureidos contienen cantidades significantes de XDH (53). Es por esto la importancia de caracterizar la XDH presente en nódulos de frijol y compararla con otras estructuras para conocer su importancia en la simbiosis.

Regulación

La XDH fué caracterizada recientemente, estudios relacionados con la regulación en plantas superiores eran pocos; sin embargo en la última década, varias líneas de investigación en diferentes grupos de plantas han proporcionado evidencias sobre distintos mecanismos regulatorios de la actividad de XDH en tejidos de plantas. Un aspecto particular de la regulación de XDH está relacionado a la composición de la enzima. A semejanza de todas las molibdo proteínas, excepto para la nitrogenasa, la XDH contiene el mismo cofactor molibdeno que la nitrato reductasa, aldehído oxidasa, sulfito oxidasa y formato deshidrogenasa (17,31). La pérdida simultánea de XDH y actividad de nitrato reductasa se reportaron en mutantes de *Aspergillus nidulans*, *N. crassa*, cultivo de callos de tabaco, *C. reinhardtii*, chícharo y *A. thaliana*. Estas mutantes no sintetizan el cofactor molibdeno pero producen la apoproteína.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fué purificar, caracterizar y producir anticuerpos policlonales de la XDH de nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. *Negro jamapa* infectados con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y compararla con la XDH de otros tejidos de la planta.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar y purificar la xantina deshidrogenasa de nódulos de *Phaseolus vulgaris* infectados con *Rhizobium tropici* CIAT 899.

Caracterización de la xantina deshidrogenasa de nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

Producción de anticuerpos policlonales en conejo a partir de la XDH purificada a homogeneidad de nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

Comparación de la XDH de nódulo con la XDH de otros tejidos de *Phaseolus vulgaris* variedad *Negro jamapa*.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Phaseolus vulgaris variedad *Negro jamapa*
Rhizobium tropici CIAT 899 (Martínez, E. y col.)

REACTIVOS QUÍMICOS

Marcadores de alto peso molecular para PAGE-SDS Sigma Chemical
acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, persulfato de amonio, urea BIO RAD
NAD⁺ (nicotin adenina dinucleotido), fosfatasa alcalina Sigma Chemical
sulfato de amonio, trizma base, glicina, azul de tetrazolium, pvpp
(polivinilpirrolidona), Sigma chemical. azul de coomassie G y R 250,
DTT BIO RAD. DEAE Sephacel, Sephacryl S-300, Blue- Sepharosa 6 Cl.
Sigma Chemical ; glicerol, fosfato ácido y dibásico de potasio, bisulfito
de sodio, molibdato de sodio y EDTA Sigma Chemical.

Cultivo de plantas

Se germinaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* variedad *Negro jamapa*) previamente esterilizadas con hipoclorito de sodio concentrado durante 2 min y enjuagadas muy bien con agua estéril. Se colocaron éstas en charolas de aluminio con papeles previamente empapados con agua en condiciones de esterilidad y manteniéndose a una temperatura de 30° C durante tres días. Las semillas ya germinadas se sembraron en el invernadero y se inocularon con la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899 crecida toda la noche. Las plantas se regaron con solución de Hoagland libre de nitrógeno. Los nódulos fueron cosechados a los 9,11,14,18,21 y 25 días después de la inoculación y se les determinó actividad de xantina deshidrogenasa.

Determinación enzimática

Todos los ensayos enzimáticos fueron realizados a 30° C. La actividad de xantina deshidrogenasa (EC. 1.2.1.37), fué detectada espectrofotométricamente siguiendo la producción de NADH a 340 nm. El ensayo contiene 20 mM de xantina, 20 mM de NAD⁺, en buffer Tris/HCl 0.1M pH 8.0 (52) y enzima a un volumen final de 1.25ml. (37,44,52 y 55).

PURIFICACION DE LA XDH

Extracción de la XDH (Modificación a las técnicas de extracción utilizadas por Triplett, E. 1985, Nguyen, J. y col. 1986 y Seybold, W.D. 1974).

Se maceraron 50 gr. de nódulos, recién cosechados o congelados a -70° C, dos volúmenes de buffer de fosfatos 0.1M pH 7.8, 0.001M EDTA, 0.002M PMSF y 0.002M DTT (37,49,53), 1% de PVPP insoluble. Se utilizó un mortero previamente enfriado y se maceró el tejido con hielo seco o nitrógeno líquido. Los homogenados se pasaron a través de varias capas de gasa e inmediatamente se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 4° C., se descartaron la pastilla y se conservó el sobrenadante (extracto crudo).

Fraccionamiento del extracto crudo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El extracto crudo obtenido se precipitó en un rango de concentración de sulfato de amonio sólido de 0-25%, se agitó suavemente durante 20 minutos a 4^o C y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se volvió a precipitar con sulfato de amonio sólido a una concentración de 25 a 40%; se agitó durante 20 minutos y se centrifugó por otros 20 minutos a 14000 rpm. La pastilla resultante se resuspendió en 4 ml. de buffer de extracción y se calentó durante 5 minutos a 68^o C (53); se centrifugó para quitar el material insoluble. En cada una de las etapas se determinó actividad enzimática y concentración de proteínas por el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina como estandard (14).

Filtración Molecular Sephacryl s-300

La cromatografía de filtración molecular sephacryl S-300 permitió la separación de proteínas de alto y bajo peso molecular presentes en el precipitado obtenido de la etapa anterior, debido a que las primeras son excluidas rápidamente de la matriz mientras que las últimas son retenidas y por lo tanto se logró la purificación parcial de la XDH.

La muestra se aplicó a una columna de filtración molecular Sephacryl S-300, 50x3.6 cm., previamente equilibrada con buffer de fosfatos 0.1 M pH 8 (1mM DTT, 5% de glicerol, 0.02% de azida de sodio, 1mM EDTA y 0.02mM de PMSF). El flujo fue de aproximadamente 30 ml/h. Se colectaron fracciones de 2.5 ml a las cuales se les determinó actividad de XDH y proteína a 280 nm.

Cromatografía de afinidad Blue-sepharose 6 Cl.

La cromatografía de afinidad Blue-Sepharose 6-Cl se utilizó en la purificación de la XDH de soya reportada por Triplett y col.(1982) por su gran especificidad a la mayoría de las enzimas que se unen a anillos de las purinas y principalmente las deshidrogenasas muestran gran afinidad por el Cibacron Blue F3GA.

Las fracciones con mayor actividad de XDH obtenidas de la columna de filtración se aplicaron a una columna de azul de Sepharosa 6 Cl. (1.3 X 10 cm.) preequilibrada con buffer de corrida (Tris/HCl 0.1M, 1mM DTT, glicerol 5%, 0.02% NaN , 0.2mM PMSF y 1mM EDTA). Se aplicó un

gradiente linear de NAD^+ 0.5mM (52)nuevamente, se colectaron fracciones de 2.5 ml. y se les determinó actividad enzimática y concentración de proteínas por el método de Bradford (14).

Análisis electroforético en condiciones nativas y desnaturalizantes.

Se prepararon geles nativos de poliacrilamida al 6% en el gel separador y 4% en el gel concentrador. Se corrieron a voltaje constante de 50 V. durante aproximadamente 12 h. a 4^o C.(26) Las bandas de proteína fueron detectadas por tinción con azul de Coomassie R 250 y la actividad in situ de xantina deshidrogenasa se detectó lavando previamente el gel con buffer de fosfatos 0.1M pH 8.0 e inmediatamente incubándolo en buffer conteniendo 2mM de xantina, 0.6 mM de fenazina metasulfato y 0.6 mM de azul de tetrazolium; la reacción se lleva a cabo en la obscuridad a 30^oC durante 15 minutos. La presencia de una banda coloreada indica la actividad enzimática llevada a cabo por la enzima; al control se le agrega lo mismo excepto xantina (37,53,55).

La presencia de subunidades fué determinada por electrofóresis en geles de SDS-poliacrilamida al 7.5% de acuerdo a la técnica de Laemmli, las muestras y los marcadores de peso molecular de proteínas se hirvieron durante 5 minutos en buffer de muestra 2x, se colocaron en los pozos y se corrieron durante 3 a 4 hs. a voltaje constante. Las proteínas que se utilizaron como marcadores de peso molecular fueron miosina (200 kD), β -galactosidasa (116 kD), fosforilasa b (98 kD), albúmina sérica bovina (66 kD), albúmina de pollo (45kD) y anhidrasa carbónica (29 kD).

Producción de anticuerpos

La xantina deshidrogenasa pura (500 ug), se mezcló con un volúmen igual de adyuvante completo de Freund's a un volúmen final de 1 ml., éste se inyectó intramuscularmente a un conejo, a las cuatro semanas se aplicó un refuerzo con otros 500 ug de la enzima (37). Quince días después se sangró el conejo y se purificó la fracción de gamma globulinas del suero por precipitación con sulfato de amonio saturado al 33%. A continuación se paso por una columna de intercambio iónico: DEAE-Sephacel. Las fracciones de inmunoglobulinas se dialisaron en 20 mM de PBS y se guardaron a -20 C. El suero preimmune se tomó del conejo antes de que fuera inmunizado.

Perfil de actividad de pH

Para determinar el pH óptimo de la XDH presente en nódulo y en raíz se utilizaron buffers con un rango de pH 4-12. Para el rango de pH 4-6.5 se usó Tris-hidrocloreuro, buffer de fosfatos para el rango de 6.5-8.5 y Tris-base para el rango de 8.5-12.0 a concentración de 0.1 M. (42).

Análisis electroforético de la XDH en doble dimensión (O' Farrell)

La enzima pura se analizó por electroforesis en doble dimensión (O' Farrell). La electroforesis para la primera dimensión fué realizada en tubos conteniendo 28.38% de acrilamida y 1.62% de bis-acrilamida; el rango de pH de 3-10 se formó con anfolinas (Byo-Lytes. Bio-Rad), en proporción de 1.6% pH 5-7, y 0.4% pH 3-10. Estos geles se precorrieron a 200, 300 y 400 volts durante 15, 30 y 60 min. respectivamente, después se aplicó la muestra y se corrieron a 400 volts durante 18 h.

Una vez pasado este tiempo se saca el gel del tubo, se preequilibra y se corre en un PAGE-SDS al 7.5 % de acrilamida. Se corren a 20 mA durante 4 h. El gel se tiñó con azul de coomassie para observar protefna.

TECNICAS INMUNOLOGICAS

Técnica de Ouchterlony

La fracción de anti-XDH se analizó por la técnica de doble inmunodifusión de acuerdo a Ouchterlony sobre placas de agarosa al 1% p/v; en el centro se colocó al antígeno y alrededor se pusieron diferentes diluciones de anticuerpo. La reacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche (36,37,53).

Inmunotitulación

El análisis por inmunotitulación se llevó a cabo incubando 1 h. a 4^o C extractos de nódulo, raíz y una mezcla de ambos con las mismas unidades de actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de anti XDH 0-30 ug. Después de la incubación se centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos y se tomaron 100 ul del sobrenadante para determinar la actividad de XDH. (37).

Inmunoprecipitación

La técnica de inmunoprecipitación se realizó agregando 4ul de antiXDH a 2 unidades de actividad enzimática de extractos de nódulo y raíz llevados a un volumen final de 200ul con buffer PBS (10 mM de fosfatos, 15 mM de NaCl pH 7.2). Las mezclas se incubaron a 4oC durante 2 hs, una vez transcurrido este tiempo de reacción se agregó GAR (anticuerpo de cabra anticonejo) para permitir una mayor amplificación de la reacción antígeno-anticuerpo. Esta mezcla se paso a un gradiente de 1 a 0.5M de sacarosa en PBS, se centrifugo. en un rotor de ángulo fijo durante 15 minutos a 9 000 rpm., se recuperaron los paquetes y se analizaron por electroforésis en condiciones desnaturalizantes (37).

Inmunodetección

La inmunodetección de la XDH se hizo por la técnica de electrotransferencia a papel de nitrocelulosa (Western blot). Los extractos de nódulo, raíz y la enzima pura de nódulo se corrieron en electroforésis desnaturalizantes y se transfirieron a papel de nitrocelulosa en una cámara de transferencia durante 18 h a 350 mA a 4°C. Después de este tiempo los geles se tiñeron con azul de Coomassie ó bién el papel de nitrocelulosa con Ponceau para observar la eficiencia de la transferencia. La inmunodetección se realizó lavando el papel de nitrocelulosa al 3% de albúmina sérica bovina en buffer TBS 1x durante 2 h. a 42° C con agitación. Posteriormente el papel de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo anti XDH disuelto en buffer TBS 1x durante 3 h. Pasado este tiempo se quitó el anticuerpo y el papel de nitrocelulosa se lavó varias veces con buffer TBS 1x 0.1% NP-40 por 10 min. cada vez; inmediatamente se incubó con anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina (AP) en una dilución 1:5000 en TBS 1x durante 30 min. a temperatura ambiente. La actividad de fosfatasa se reveló con NTB y BCIP desarrollando un color púrpura oscuro en el sitio donde se localiza el antígeno (catálogo BIO RAD 1991).

Resultados

Actividad de XDH durante la simbiosis.

Se observó un marcado incremento en la actividad específica de la XDH durante el desarrollo de los nódulos de frijol, inoculados con la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899, crecidas en invernadero. Mientras que en extractos de raíz de 21 a 25 días, se observaron niveles muy bajos de esta actividad específica que va de 0.027 - 0.030 como se puede observar en la Fig.1. La XDH de nódulos de frijol, a partir del día 9 presentó incrementos en la actividad específica de 0.48, manteniéndose en 5.7 desde el día 18 hasta el 25, período en el cuál se cosecharon los nódulos para llevar a cabo la extracción y purificación de la xantina deshidrogenasa.

pH óptimo de la XDH de nódulo y raíz

Para el estudio de pH óptimo se utilizaron extractos de nódulo y raíz precipitados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25-40% se usaron buffers con un rango de pH de 4-12 con el objeto de conocer el pH óptimo de la XDH de ambos tejidos. El análisis muestra que el pH óptimo para la enzima XDH de nódulo es de 9.0 y para la XDH de raíz se encontraron dos picos máximos de actividad, a pH 7.0 y a un pH de 9.0. Estos datos obtenidos por triplicado nos sugieren que las enzimas XDH presentes en raíz y nódulo no son idénticas, Fig.2.

Purificación de la XDH.

Preparación del extracto crudo.

Los pasos de purificación que se siguieron para la purificación de la xantina deshidrogenasa (XDH) de nódulos de frijol fueron los siguientes: 50 gr. de nódulos fueron homogeneizados en buffer fosfato de potasio dibásico 0.1M, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH 8.0 en presencia de 1% de polivinilpirrolidona insoluble (PVPP) para inhibir la actividad de derivados de fenoles y quinonas presentes en los extractos provenientes de plantas, fenilmetil sulfonilfluoruro (PMSF) 0.2mM un potente inhibidor de proteasas y EDTA 1mM para evitar inactivación por nucleasas, todo esto se llevo a cabo a 4°C. A continuación el homogenado se paso por varias capas de gasa para eliminar los restos de pared de los nódulos e inmediatamente se centrifugó a 15000 rpm durante 20 min. a 4°C. Se descartó el precipitado y la fracción soluble (extracto crudo) con una actividad específica de 23.43 U/mg de proteína, se uso para continuar la purificación.

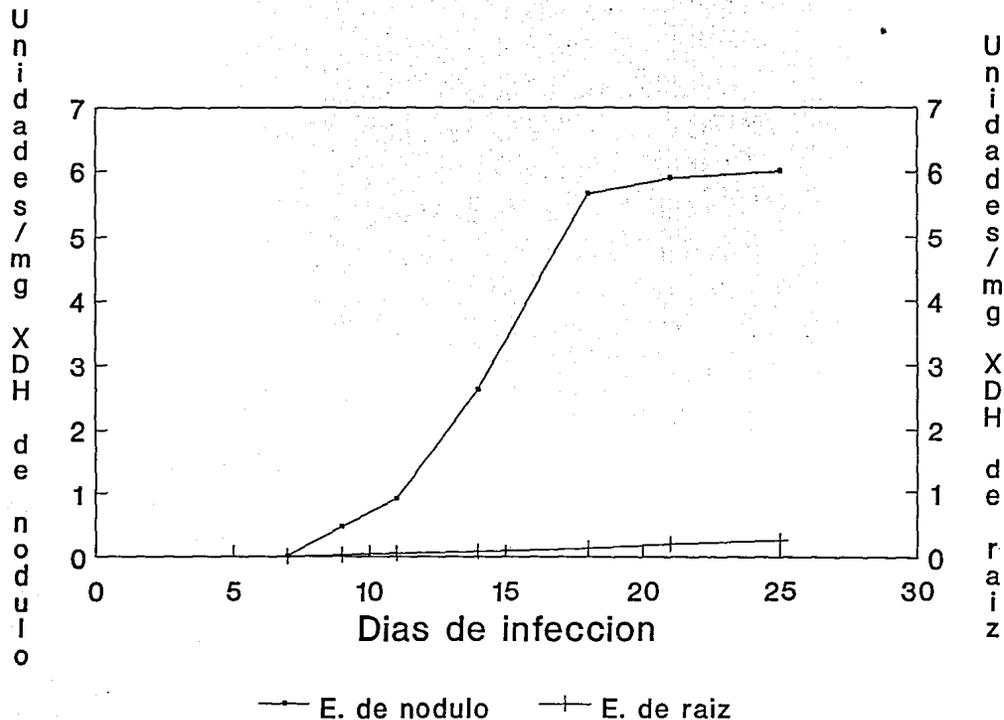


Fig. 1 Cinética de la actividad de la XDH en el desarrollo de nodulos infectados con *R. tropici* CIAT 899.

Fraccionamiento del extracto crudo con sulfato de amonio.

El fraccionamiento del extracto crudo se realizó con sulfato de amonio sólido. Para conocer el porcentaje de saturación en el cuál la proteína precipita, se probaron diferentes rangos de saturación de sulfato de amonio que fueron desde 0-20%, 20-30%, 30-40% y 40-45% y se encontró que la xantina deshidrogenasa de nódulos de frijol en el rango de 0-20% no precipitó mientras que en rangos de saturación de 20-30,30-40 y 40-45 %, precipitó el total de la actividad de XDH. Por lo anterior se procedió a utilizar un rango de saturación de 25-40% que permitió obtener una actividad específica de 43.98 U/mg. hielo, el precipitado se eliminó por centrifugación a 15000 rpm a 4°C durante 15 min. Se obtuvo una actividad específica de 106.47 U/mg. en el sobrenadante. El sobrenadante se colocó en la columna de filtración molecular Sephacryl S-300 preequilibrada con buffer fosfatos 0.1M pH 8.0 (0.02% de NaN₃, 0.02mM de PMSF, 1mM de DTT y glicerol al 5%) y se eluyó con el mismo buffer. Las fracciones con mayor actividad se combinaron y se concentraron con pletilenglicol (PEG) obteniéndose una actividad específica de 204.04 U/mg. ésta muestra se aplicó a una columna de afinidad.

Cromatografía de afinidad. Se usó una columna de afinidad sefarosa azul de 7.5 ml. la cuál fué previamente equilibrada con buffer de elución (BE) Tris/HCl 0.1M pH 8.0, 0.02mM PMSF, 1mM DTT, 0.02% NaN₃, glicerol 5%. Se colocaron 30 ml. de la muestra provenientes de la columna de filtración molecular, y se lavó con 100 ml. del buffer de elución. Después se le agregó un gradiente discontinuo de NAD⁺ de 0, 0.05, 0.5, 1.0 y 2.5mM. Se encontró que la xantina deshidrogenasa eluía a una concentración de 2.5mM de NAD⁺, por lo que se eluyó con un gradiente lineal de 0-5mM de NAD⁺. El perfil de proteína y actividad enzimática muestra que la mayoría de la proteína no se adsorbió a la columna mientras que la XDH se adsorbe específicamente. El gradiente de 0-5 mM de NAD⁺, permitió una recuperación de 7.11% de la XDH Fig.3. La mezcla de las fracciones con mayor actividad eluidas de sepharosa azul, se concentraron y se usaron para la producción de anticuerpos policlonales. La actividad específica de la XDH al final de la columna de sefarosa azul, fué de 2692.16 U/mg, lo que representa 114.9 veces de purificación, tabla 1. Los datos obtenidos de rendimiento y purificación de la XDH son muy semejantes a los reportados por J. Nguyen y col 1978 y por Triplett y col. 1982 en la purificación de XDH de nódulos de soya. La enzima purificada es estable durante varias semanas a -20°C en presencia del buffer con 3mM de NAD⁺.

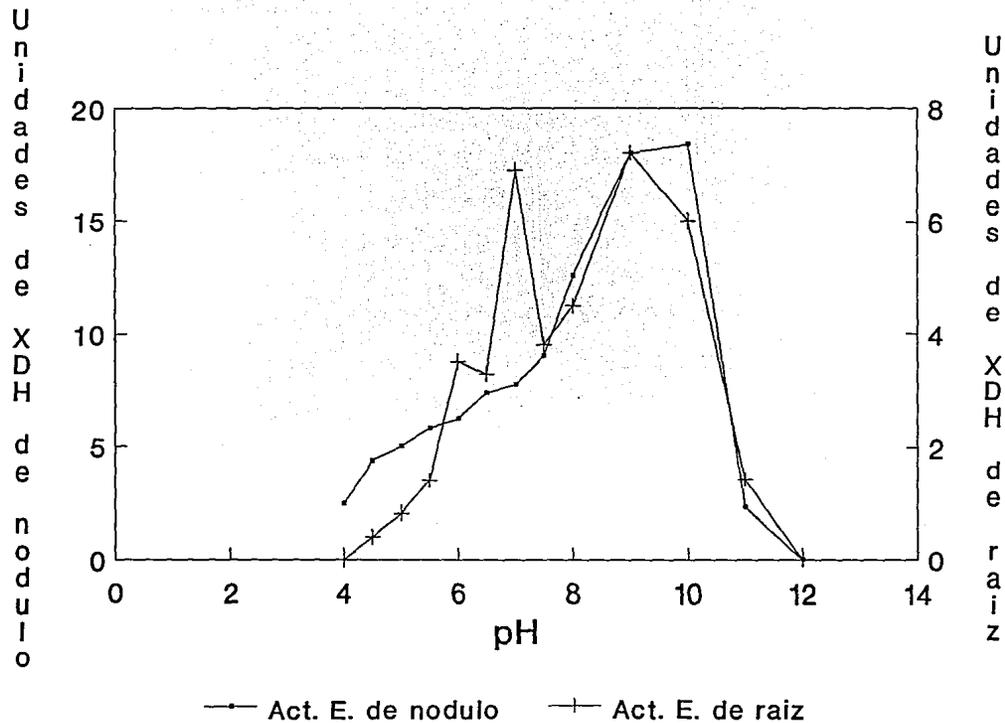


Fig. 2 Perfil de pH de la XDH de nódulo y raíz

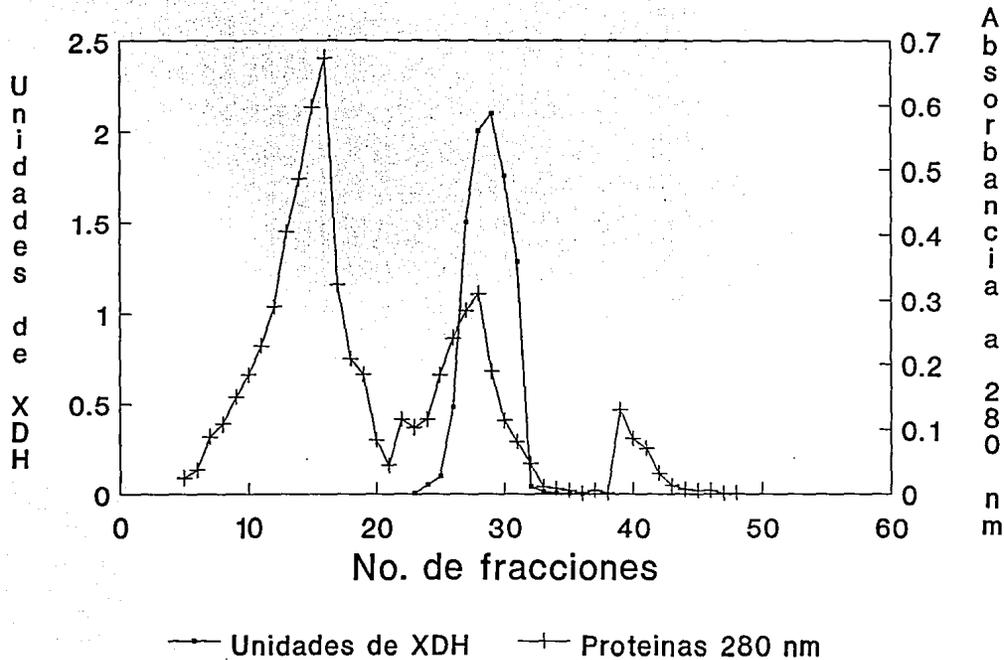


Fig. 3 Cromatografía de afinidad Azul de sepharosa 6 Cl

NODULO	U. de E.	mg prot tot	Act. Esp.	Recup.	Purif.
E. crudo	9458.0	403.58	23.43	100	1
* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6376.2	144.95	43.99	67.41	1.88
calentamiento 68°C/5	4276.5	40.17	106.47	45.21	4.54
Sephacryl S-300	3460.0	16.96	204.00	36.50	8.71
Azul de Sepharosa	673.04	0.25	2692.16	7.11	114.90

*25-50% Saturacion

TABLA I. Etapa de purificación de XDH de nódulos de frijol.

HIPOCOTILO	U. de E.	mg prot tot.	Act. Esp.	Recup.	Purif.
E. crudo	32.39	12.10	2.67	100	1
* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21.46	7.50	2.86	66.25	1.07
calentamiento 68°C/5	7.18	2.25	3.18	22.17	1.19
Sephacryl S-300	5.46	0.62	8.80	16.86	3.28
Azul de Sepharosa	0.20	0.007	28.57	0.62	10.70

* 25-50% Saturacion

TABLA II. Etapa de purificación de XDH de hipocotilo de frijol.

Análisis electroforético en condiciones nativas y desnaturalizantes.

El análisis de cada uno de los pasos de la purificación se realizó en geles de poliacrilamida nativos y desnaturalizantes. Los geles nativos se corrieron a 50 volts aproximadamente durante 12 h a 4°C, después de este tiempo se tiñieron para proteína usando azul de Coomassie. Para determinar la actividad in situ de la XDH los geles se incubaron con buffer de fosfatos 0.1M pH 8.0, conteniendo xantina 2mM, 0.6% de fenazina metasulfato y 0.6% azul de nitrotetrazolium, a 30°C durante 5-15 minutos. Esta reacción se llevo a cabo en la obscuridad para teñir la banda correspondiente a la actividad de la XDH de un color violáceo. El resultado de la actividad de XDH en gel, mostró la presencia de una sola banda de actividad fig.5. En el gel incubado en el buffer con la mezcla de reacción sin xantina no se observó la banda de actividad con lo que se demostró que la reducción del azul de nitrotetrazolium, es debida al desarrollo de la actividad de la enzima XDH que es dependiente de la presencia de xantina. Por otro lado en el análisis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, se observó un enriquecimiento de la banda correspondiente a la xantina deshidrogenasa sobre todo en las fracciones correspondientes a la cromatografía de afinidad; en la que se observó únicamente dos bandas: una mayoritaria con peso molecular aproximado de 142 kD y otra de 128 kD. Las proteínas marcadoras de peso molecular fueron de un rango de 200 a 29 kD. Fig.4

Los datos anteriores sugieren que la XDH de nódulos de frijol, es un dímero compuesto por dos tipos de subunidades o bien que esta enzima pudiera estructurarse en dos homodímeros de polipéptidos diferentes.

Producción de anticuerpos policlonales.

Una vez realizado el análisis de las fracciones por electroforesis para observar el grado de pureza de la XDH se procedió a inyectar al conejo con 500 ug. de la fracción obtenida por cromatografía de afinidad mezclado con adyuvante Freund's completo, para promover una mayor respuesta inmune. A los quince días de realizada la primera inyección, se procedió a dar un refuerzo con 250 ug. de XDH, dos semanas después se extrajo sangre para probar el título de anticuerpos presentes y realizar los ensayos correspondientes. Antes de la primera inyección, se le extrajo sangre al conejo para preparar el suero preinmune.

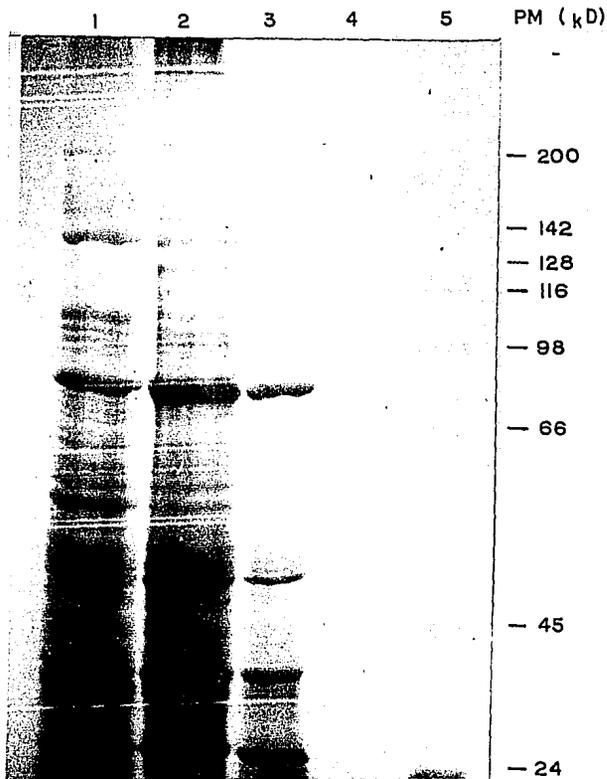


Fig.4 Análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) de las diferentes etapas de purificación de la XDH de nódulos de frijol. Carril 1).- E. crudo, 2).-25-50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3).-Sephacryl S-300 4).- Azul sepharosa 6 Cl 5).-Marcadores de PM (Miosina 200 kD, B-galactosidasa 116 kD, fosforilasa b 98 kD, Albúmina sérica bovina 66 kD, Albúmina de pollo 45 kD y Anhidrasa carbónica 29 kD.

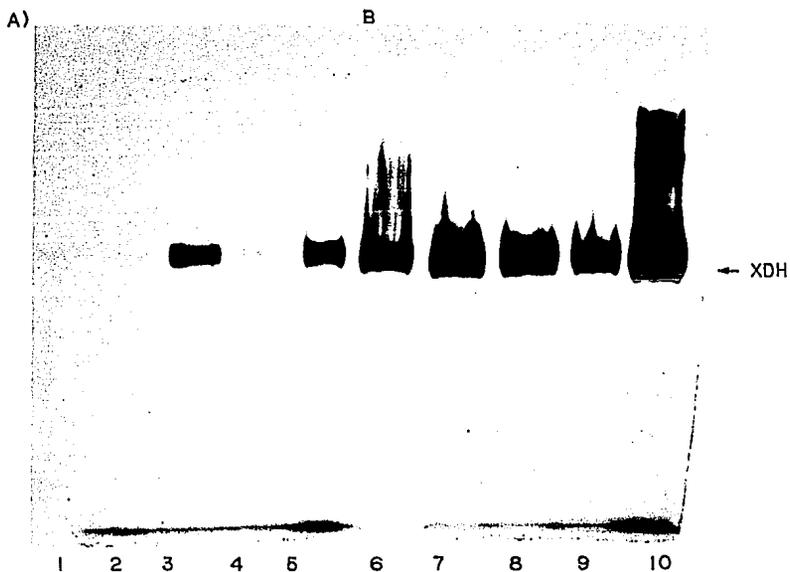


Fig.5 Análisis electroforético de la XDH en condiciones nativas de nódulo e hipocotilo. A.-hipocotilo 1).- extracto crudo 2).- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sin calentar 3).- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ calentado 4.- sephacryl s-300 5.- azul de sepharosa. B.-nódulo 6).- extracto crudo 7).- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sin calentar 8).- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ calentado 9).- sephacryl s-300 10).- azul de sepharosa.

Especificidad del antisuero de conejo contra XDH de nódulos de frijol.

La presencia de anticuerpos contra XDH se probó por análisis de doble difusión descrito por Ouchterlony. Utilizando diluciones seriadas del antisuero 1/1, se observó una sola banda de precipitación en presencia de enzima pura de nódulo a una dilución de 1/8 se observó una sola banda con extracto de nódulo concentrado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45% como se observa en la Fig.6. Por otro lado, ninguna banda de precipitación se observó con suero preinmune (dato no mostrado). Una vez comprobada la presencia de anticuerpos anti-XDH se determinó por inmunotitulación la cantidad de anticuerpo necesaria para precipitar la actividad de la XDH de extractos de nódulo. Con este fin se incubaron 2 unidades de actividad durante 1 h a 4°C con diferentes concentraciones de anti-XDH (0-30ug). Al término de la incubación se agregó 0.1 mg de anticuerpos de cabra anticonejo (GAR) por 1 h. a cada una de las muestras lo que permite tener una mayor eficiencia de precipitación de la XDH. Las mezclas de incubación se centrifugaron durante 10 min. a 9000 rpm en un rotor de ángulo fijo. Los precipitados obtenidos con anticuerpos se analizaron en geles de poliacrilamida al 7.5%. En el suero preinmune no hay reconocimiento antígeno-anticuerpo, mientras que en las diferentes concentraciones de anticuerpo antiXDH se nota una mayor precipitación de la enzima cuando se aplicaron 4. ul del anticuerpo. Cantidades mayores del anticuerpo generaron una precipitación inespecífica que interfirió en el ensayo por lo que se concluyó que la cantidad de anticuerpos anti-XDH para precipitar de manera eficiente la XDH es de 4 ul como se observa en la Fig. 7. Una vez obtenidos estos datos se realizó la caracterización de XDH tanto de nódulo como de raíz por inmunoprecipitación de los extractos observándose que en suero preinmune en presencia de extractos de nódulo no hay ninguna reacción antígeno-anticuerpo. En los extractos de nódulo precipitados con suero antiXDH se observaron dos bandas de un peso molecular aproximado de 142 y 128 kD.; mientras que en los extractos de raíz se observaron preferentemente la banda de 128 kD y otra banda común de peso molecular aproximado de 98 kD. Se observaron otras bandas menores que parecieran ser productos de degradación Fig.8

El análisis de inmunotitulación de los extractos de nódulo, raíz y una mezcla de nódulo y raíz con suero antiXDH, se realizó incubando una actividad constante de 5 nmolas de NADH producido por minuto (5 Unidades de enzima) de cada uno de los extractos con el anticuerpo anti-XDH durante 1 h a 4°C . Después de la incubación se centrifugaron a 10 000 rpm. durante 15 min. y se determinó la actividad residual de XDH en el sobrenadante. Se utilizó suero preinmune como control de la reacción. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos de nódulo incubados

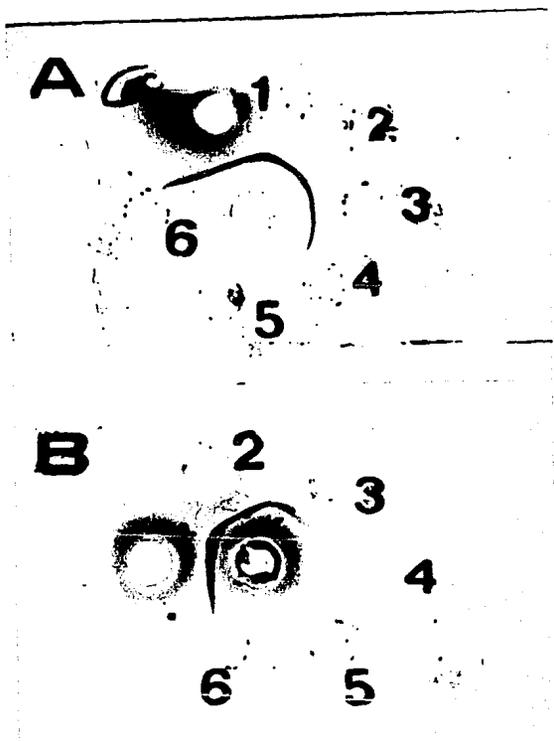


Fig.6 Inmunodetección por la técnica de Ouchterlony con antisuero de anti XDH con extractos de E. crudo de nódulo (B) y enzima pura de nódulo (A).

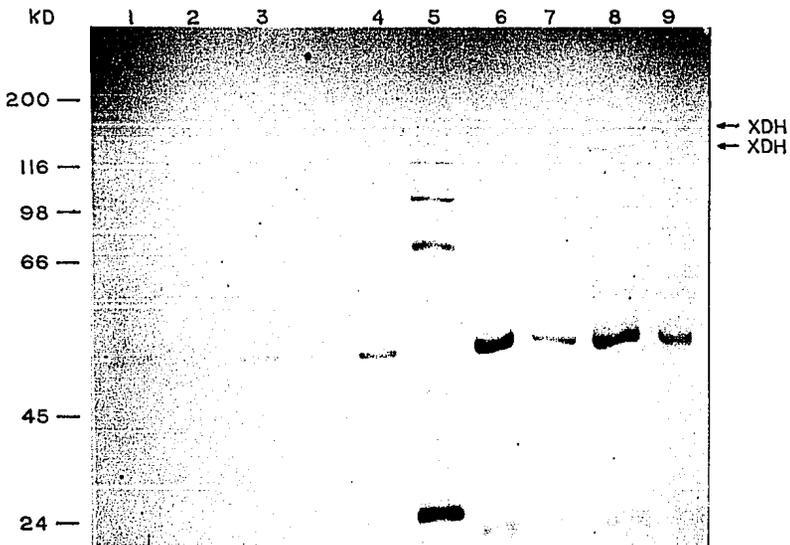


Fig.7 Inmunoprecipitación de E. de nódulo a diferentes concentraciones de antiXDH carril 1 y 2).-suero preinmune,3).- 1 ul de antiXDH, 4).- 2ul de antiXDH, marcadores de peso molecular, 6 y 7).- 4 ul de antiXDH, 8 y 9).- 6 ul de antiXDH.

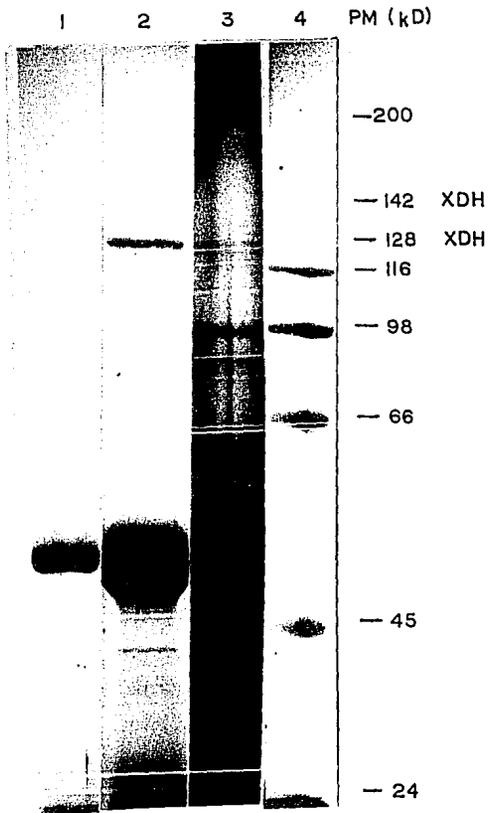


Fig. 8 Análisis por PAGE-SDS de inmunoprecipitados de nódulo y raíz carril 1).- E. de nódulo con suero preinmune 2).-E. de nódulo con antiXDH 3).- E. de raíz con anti XDH 4).- marcadores de peso molecular.

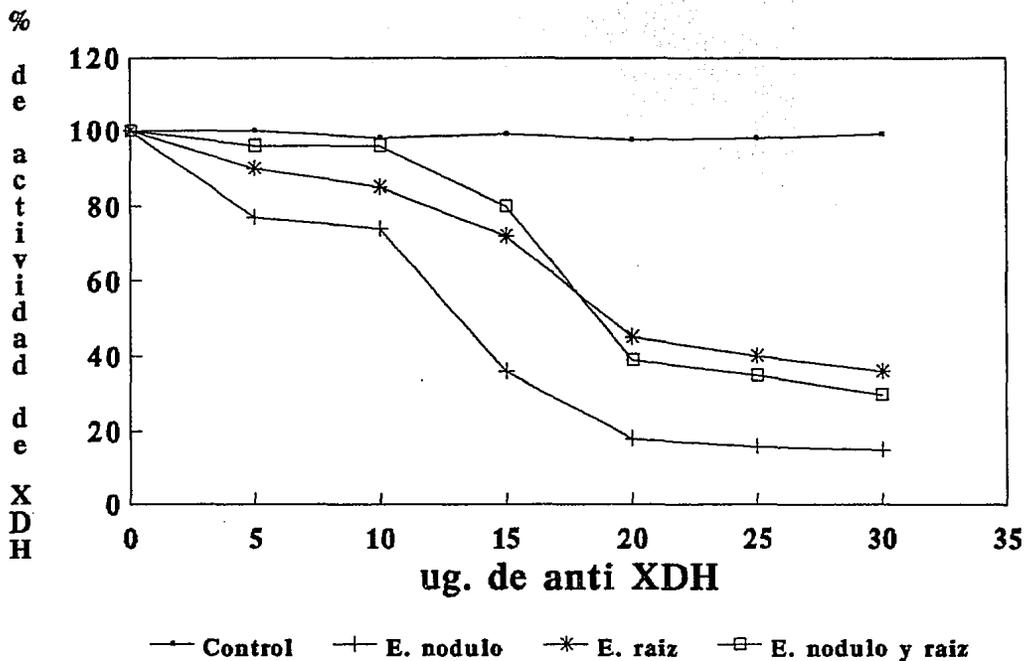


Fig.9 Inmunotitulacion de extractos de nodule, raiz y mezcla de nodule y raiz con antiXDH.

con el suero preinmune mantienen el 100% de la actividad de XDH durante la incubación. Por otro lado se observó que en extractos de nódulo incubados con 12.5 ug de anti XDH pierden el 50% de actividad de XDH. El comportamiento de raíz es diferente ya que para bajar al 50% la actividad de la XDH se requiere casi el doble de la cantidad de anti-XDH (25 ug), requerida para bajar el 50% de actividad de nódulo. El comportamiento que se presenta en la mezcla de nódulo y raíz es muy semejante al que presenta raíz, Fig.10.

Análisis del ensayo de inmunodetección de la XDH.

Se corrieron geles de poliacrilamida al 7.5% con 25 ug de extractos de nódulo, raíz y la XDH pura de nódulo en condiciones desnaturalizantes a 100 volts durante 2h. y se transfirieron a papel de nitrocelulosa durante toda la noche a 360 mA. El papel se reveló con Ponceau para determinar si hubo una adecuada transferencia de proteínas; una vez realizado ésto se procedió a bloquear el papel con albúmina sérica bovina al 3% a 42°C en agitación constante durante 2 h., se agregó el suero antiXDH y se incubó durante 2 h. con agitación. Posteriormente se lavó el papel con 15 ml de buffer Tris/HCl y NP-40 durante 10 min tres veces y se le agregó el segundo anticuerpo; en este caso se empleó una dilución 1:5000 de GAR acoplado con fosfatasa alcalina. Se incubó por aproximadamente 30 min., después se lavó y se le agregó la solución para revelar la actividad en la oscuridad. Una vez que empiezan a aparecer las bandas se detiene la reacción con ácido acético al 20% . Los resultados obtenidos muestran que en nódulo la XDH esta constituida por dos péptidos: uno de 128 kD que es el más abundante y un segundo de 142 kD, como se puede observar en la fig.10. En raíz lo que se observa es una reacción cruzada con una gran cantidad de péptidos presentes en el extracto.

Análisis de la XDH de nódulo por electroforesis de doble dimensión.

Para este análisis de la XDH pura de nódulo, se corrió en electroforesis de doble dimensión tipo O'Farrell. Se observaron más de un componente polipeptídico mientras que en raíz parcialmente purificada no se observó nada.

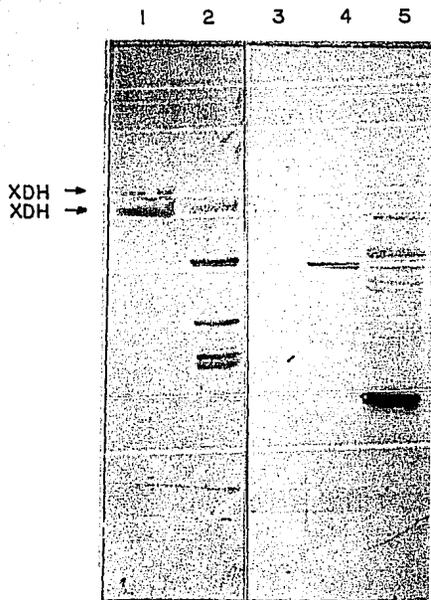


Fig.10 Análisis por Inmunodetección (Western blot) de hypocotilo y nódulo. 1.-XDH pura de nódulo 2.-e. crudo de nódulo 3.-XDH pura de hypocotilo 4.-sephacryl s-300 hypocotilo 5.-e. crudo de hypocotilo.

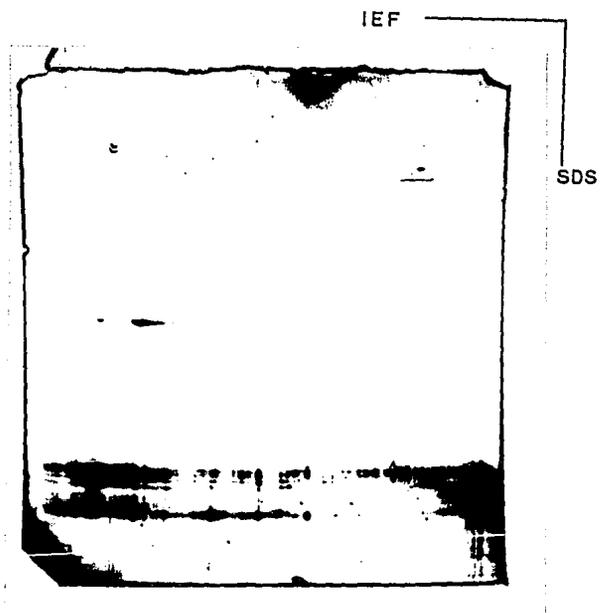


Fig.11. Análisis de la XDH pura de nódulos de frijol por gels doble dimension (O'Farrell).

Discusión

La biosíntesis de uréidos vía xantina deshidrogenasa produce ventajas significativas para el balance energético del nódulo. El proceso de fijación de nitrógeno en nódulos es dependiente del suplemento de productos fotosintéticos usados no sólo como sustratos, para la generación de poder reductor y energía sino también para la producción de esqueletos de carbono necesarios en la síntesis de compuestos de nitrógeno. La enzima XDH dependiente de NAD participa en la producción de poder reductor. En resumen el costo de carbono para la biosíntesis de uréidos como una forma de transporte de nitrógeno es mínimo dado que solo un carbono se requiere para asimilar un nitrógeno, mientras que de 2 a 2.5 carbonos son necesarios para transportar un nitrógeno en asparagina y glutamina. De esta manera parece que el costo de la fijación de nitrógeno en leguminosas productoras de uréidos parece ser más bajo que en leguminosas formadoras de amidas. Schubert, K.R.(1982) y Triplett y col. (1980) han estimado que por cada nitrógeno transportado como uréidos, de 6 a 9 equivalentes de ATP son salvados en comparación con el transporte de asparagina o glutamina Fig.B

En nódulos de frijol la actividad específica se incrementó notablemente a partir del día 14 después de la infección con una actividad específica de 1; permaneciendo en 5.7 a partir del día 18 al 25; en este período la cantidad de enzima permaneció estable, lo que demuestra que el incremento en la actividad durante el desarrollo del nódulo es causado por un incremento en la cantidad de enzima. En estudios realizados por J.Nguyen y col. en XDH de nódulos de soya, se encontró que la actividad en extractos de nódulo se incrementa notablemente durante las dos semanas siguientes a la inoculación manteniéndose una actividad máxima por cuatro semanas. Estos datos demuestran que el incremento de la actividad de la XDH durante el desarrollo del nódulo es causado por un aumento en la cantidad de enzima. La actividad de XDH de hipocotilo se encontró en niveles muy bajos, como se puede observar en las diferentes etapas de purificación que se llevaron a cabo para su purificación, obteniéndose una recuperación del 0.62% probablemente debido a la presencia de proteasas o bien a la falta de algún cofactor para estabilizar su actividad. El valor de pH óptimo reportado para varias xantina deshidrogenasas en varias plantas superiores son similares: la XDH de nódulos de soya exhibe un pH óptimo de 7.6 (10), un valor máximo de 7.9 se reportó para la XDH de nódulos de garbanzo (63), un pH óptimo de 10 se encontró para xantina oxidasa de nódulos de soya (56), un pH óptimo para xantina deshidrogenasa de 8.0 para riñón de aves e hígado de rata (50), por otra parte el pH óptimo encontrado en nuestro laboratorio para la xantina deshidrogenasa aislada de nódulos de frijol fué de 9.0 mientras que para la XDH aislada de raíces presenta dos picos de actividad uno a pH de 7.0 y el otro a pH 9.0 como se muestra en

la Fig.2. Estos ensayos de pH se realizaron tanto en precipitados de nódulo como de raíz, sería interesante utilizar a la enzima pura de nódulo así como de raíz para comprobar el tipo de comportamiento.

Por otra parte los valores de actividad específica de la XDH obtenidos en nuestro laboratorio para nódulo de frijol fué de 2.69 umol/min/mg de proteína y para hipocotílos fue de 0.0286 umol/min/mg de proteína, comparando con la XDH obtenida de nódulos de soya, que se calculó ser de 2.4 umol/min/mg (52) y 2.2 umol/min/mg (10) mientras que la enzima parcialmente purificada de nódulos de *P.vulgaris* fué de 2.6 umol/min/mg.(9). Se han reportado valores similares de actividad específica de XDH de otras fuentes por ejm. de 1.6 a 2.6 umol/min/mg de proteína en riñones de aves, pero muy diferentes en otros tejidos como lo es *N.crassa*. que se encontró de 0.15 umol/min/mg de proteína (28). La variabilidad en los valores de actividad específica pueden deberse principalmente por la presencia de formas inactivas de la enzima.(24), estas pudieran corresponder a moléculas de enzimas, las cuáles tienen alteradas los centros de reacción, ejemplo de ellas pudieran ser las demolibdoenzimas y desulfoenzimas.

La metodología empleada en el laboratorio permitió un rendimiento de XDH de nódulos de frijol de 7.11 %, el cuál fue muy similar a los obtenidos por Seybold, W. D. en 1974 de *Drosophyla melanogaster* cuyo rendimiento fué de 10.9%, Lyon, E.S. y cols. en 1978 en *N.crassa*. el rendimiento fué de 11 % , solo la metodología empleada por Triplett, E. W., en 1986 se obtuvo un rendimiento del 21.0% utilizando cromatografía de inmunoafinidad.

La inmunotitulación de la XDH de nódulo y raíz presentan diferencias en cuanto a la reacción de antígeno-anticuerpo debido a que la actividad de nódulo se inhibe más del 50%, mientras que el comportamiento de la XDH de hipocotilo requiere casi el doble de concentración de anticuerpo para bajar el 50 % de su actividad de XDH. El comportamiento de la mezcla de nódulo y raíz es muy semejante al que presenta el extracto de raíz. Los datos indican que la XDH de nódulo y raíz, presentan diferentes afinidades por el anticuerpo, lo que sugiere diferencias en la proteína.

Por el comportamiento presentado en el ensayo realizado se puede decir que el reconocimiento es específico para la XDH de nódulo en comparación con el resultado encontrado con la XDH de hipocotilo. En ensayos realizados por Nguyen J., y col.(37) reportan que la XDH de nódulo es una nodulina porque solo reacciona en presencia de extractos de nódulo mientras que con otras estructuras no hay ninguna reactividad. En contraposición a los datos reportados por Triplett E., y col.(53,54) utilizando anticuerpos monoclonales, encuentran que la anti-XDH de nódulo de soya tiene reacción cruzada con tallo, hojas y raíz por lo que sugieren que esta XDH no es una nodulina.

El análisis por electroforesis en condiciones desnaturalizantes de los diferentes pasos del proceso de purificación de la XDH de nódulo nos mostró, que en la fracción obtenida de la cromatografía de afinidad, se observó la presencia de dos bandas, una con un peso molecular de 142 y otra con un peso molecular de 128 kD respectivamente. Mientras que el análisis electroforético en condiciones nativas Fig.5 de las mismas fracciones solo se notó la presencia de una sola banda, en el carril 5 la XDH pura de nódulo al exponerse por tiempos prolongados con el sustrato, fenazina metasulfato y el azul de tetrazolium presentó barrido muy pronunciado. La banda presente se sugirió tener un peso molecular aproximado a 270 kD de la enzima nativa. Esto está de acuerdo con el peso molecular reportado por otros autores, en donde el peso molecular oscila de 250-350 kD de diferentes fuentes (10,28,41,42,52). Por otro lado se ha descrito que hay factores que favorecen la degradación proteolítica de la XDH como son la temperatura, el tiempo de almacenaje, el tiempo de calentamiento, así como la presencia de agentes reductores y enzimas proteolíticas, produciendo polipéptidos de menor peso molecular (7,16,24,50). De acuerdo con esto, la antiXDH podría reconocer bandas de menor peso molecular al realizar ensayos de inmunodetección tanto en geles de nódulo como hipocotilo, sugiriéndonos que estas pudieran ser productos de degradación proteolítica de la enzima en las diferentes etapas de la purificación. Donde se observa una señal más fuerte es en hipocotilo donde tal vez la degradación proteolítica sea mayor dado que hay mayor cantidad de proteasas en esa estructura y la enzima activa que se encuentra ahí es muy poca como se observa en la tabla II, mientras que en nódulo la cantidad de enzima es varias veces mayor. Para poder estudiar la XDH de raíz se trabajó con hipocotilos debido a que en estos fue posible controlar la contaminación de las plantas con otras especies de Rhizobium y así poder purificar la XDH producida en este órgano y conocer algunas de sus características estructurales. Como anteriormente se mencionó existen diferencias en el pH óptimo, ya que la XDH de nódulo presenta un solo pico de actividad que es 9 mientras que en hipocotilo se muestran dos picos máximos de actividad que son de 7 y 9 lo que sugiere junto con los datos de inmunotitulación diferencias funcionales entre las dos, debido a que hay pocos reportes de las diferencias en las propiedades de enzimas XDH de nódulo y de raíz asociadas con la oxidación de las purinas, es posible que las diferencias en el pH óptimo de actividad se deba a la falta de un requerimiento de algún cofactor como se ha reportado en otros sistemas (42). La reacción cruzada que mostraron los ensayos de inmunodetección probablemente se debieron a la presencia de pequeñas cantidades de proteínas contaminantes presentes en la muestra que no se observaron con la tinción de azul de Coomassie.

El análisis de la XDH de nódulo por doble dimensión mostró la presencia de más de un componente polipeptídico, pero el de XDH de hipocotilo no se pudo realizar por su gran inestabilidad.

CONCLUSIONES

La XDH de nódulo fué estable por al menos dos meses cuando se almacenó a setenta grados bajo cero y con 5mM de NAD⁺. posee un peso molecular aproximado de 280 KD en su forma nativa.

La XDH de hipocotilo se purificó parcialmente, solo se pudo mantener activa durante dos a tres días aún en presencia de 5 mM de NAD⁺, por lo que resultó difícil realizar los diferentes ensayos con mayor finesa.

Se encontraron diferencias de la XDH de nódulo y raíz en cuanto a pH óptimo, nódulo presento un pH de 9.0 e hipocotilo de 7 y 9.

Los estudios realizados de inmunotitulación mostraron diferencias en cuanto a la reactividad con el anti-XDH, se observó mayor especificidad por la de nódulo que por la de raíz.

En el análisis de inmunodetección (Western blot), se observó reacción cruzada de diferentes bandas de peso molecular más bajo posiblemente molibdo flavoproteinas o degradación proteolítica de la enzima XDH

En estudios de doble dimensión O'Farrell, indican una posible diferencia en cuanto a composición polipeptídica ya que la XDH de nódulo presenta más de un polipéptido, mientras que hipocotilo no se conoce aún.

Bibliografia.

- 1.-Atkins,C.A. (1982) Ureide metabolism and the significance of ureides in legumes Adv. Agr. Microb. : 53-88.
- 2.-Atkins,C.A., Shelp,B.J., Storer,P.J. and Pate,J.S. (1984).Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. *Planta* 162: 327-333.
- 3.-Atkins,C.A. Rainbird,R.M., Pate,J.S. 1980. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N -fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata*) *Z. Pflanzenphysiol.*97: 249-260.
- 4.-Atkins,C.A. and Pate,J.S. (1981) Ureide synthesis in a cell-free from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) nodules. 67: 1156-1160.
- 5.-Atkins,C.A. Sanford,P.J. Storer,P.J. and Pate,J.S.(1988). Inhibition of nodule functioning in cowpea by a xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol.*Plant physiol* 88: 1229-1234.
- 6.-Atkins,C.A. Storer,P.J., and Shelp,B.J. (1989) Purification and properties of purine nucleosidase from N -fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata*).*J.Plant Physiol* 134: 447-452.
- 7.-Batelli,M.G. (1980) Enzymic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase (D form) to oxidase (O form). *Febs letters* 113:(1). 47-51.
- 8.-Blom,J. Roelofsen,W. and Akkermans,A.D.L.(1981).Assimilation of nitrogen in root nodules of Alder (*Alnus glutinosa*). *New Phytol.* 89:321-326.
- 9.-Boland,M.J. (1981).NAD : Xanthine dehydrogenase from nodules of navy beans: Partial purification and properties. *Biochem. Int.*(2) 6: 567-574.
- 10.-Boland,M.J. Blevins,D.G. Randall,P.D. (1983) Soybean nodule xanthine dehydrogenase: a kinetic study. *Arch. Biochem. Biophys* 222: 453-441.
- 11.-Boland,M.J. Hanks,J.F. Reynolds,P.H.S. Blevins,D.G. Tolbert, H.E. and Schubert,K.R. (1982) Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodule. *Plant* 155: 45-51.

12.--Boland,M.J. Blevins,D.G. and Randall,D.D. (1983) Soybean nodule xanthine dehydrogenase: a kinetic study. Arch of Biochem. and Biophys.. 222:(2). 435-441.

13.-Boland,M.J. and Schubert,K.R..(1983) Biosynthesis of purines by a proplastid fraction from soybean nodules.Archives of Biochem and Biophys.220: 179-187.

14.-Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.Anal.Biochem.72: 248-254.

15.-Carey,F.G. Fridovich,I. and Handler,P. (1961).Preparation of several forms of xanthine oxidase by enzymic proteolysis. Biochem. Biophys. Acta 53: 440-442.

16.-Engerson,T.D. McKelvy,T.G. Rhyne,D.B. Boggio,E.B.; Snyder,S.J. and Jones,H.P. (1987) Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in Ischemic Rat Tissues. J.Clin. Invest.79: 1564-1570.

17.-Fernández,E. and Cárdenas,J. (1981). Ocurrence of xanthine dehydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii*: A common cofactor shared by xanthine dehydrogenase and nitrate reductase. Planta 153: 254-257.

18.-Fujihara,S. Yamaguchi,M. (1978). Effects of allopurinol (4-hydroxypyrazolo (3,4-d) pyrimidine on the metabolism of allantoin in soybean plants. Plant Physiol. 62: 134-138.

19.-Hanks,J.F. Tolbert,N.E. and Schubert,K.R. (1981). Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. Plant Physiol. 68: 65-69.

20.-Herridge,D.F. (1982). Use of the ureide technique to describe to nitrogen economy of field-grown soybeans. Plant Physiol.70: 7-11.

21.-Herridge,D.F. (1982). Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation Plant Physiol 70: 1-6.

22.-Herridge,D.F. Atkins,C.A. Pate,J.S. and Rainbird,R.M. (1978). Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) Plant Physiol. 62: 495-498.

23.-Ishizuka,J (1977). Preceedings of the International on soil environment and fertity management in intensive agriculture, p:618.

24.-Irie,S. (1984). Subunit constitution of electrophoretically purified xanthine dehydrogenase of avian liver.J. Biochem. 95: 405-412.

25.-Kaminski,Z.W. and Jezewska,M.M. (1979). Intermediate Dehydrogenase- Oxidase form of Xanthine Oxidoreductase in Rat Liver. Biochem.J. 181: 177-182.

26.-Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T . Nature 227: 680-685.

27.-Larsen,K. and Jochimsen,B.O. (1987). Appearance of purine-catabolizing enzymes in Fix and Fix root nodules on soybean and effect of oxygen on the expression of the enzymes in callus tissue. Plant Physiol. 85: 452-456.

28.-Lyon, E. S. Garret, R.H. (1978). Regulation, purification, and properties of xanthine dehydrogenase in *Neurospora crassa*. J.Biol.Chem. 253, 2604-2614.

29.-Marzluf,G.A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi.Microbiol.Reviews. : 437-461.

30.-Matsumoto,T. Yamamoto,Y. and Yatazagua,M. (1976). Role of root nodule in the nitrogen nutrition of soybeans II. Fluctuation in the allantoin concentration of the bleeding sap. J. Sci. Soil Manure 47: 463-469.

31.-Mendel,R.R. Buchanan,R.J. and Wray,J.L. (1984). Characterization of a new type of molybdenum cofactor-mutant in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Mol.General.Genetic. 195: 186-189.

32.-Mothes,K. (1961). The metabolism of urea and ureides. Can J. of Bot. 139: 1785-1807.

33.-Mc. Neil,D.L. and La Rue,T.A. (1984). Effect of nitrogen source on ureides in soybean Plant Physiol 74: 227-232.

34.-Mc. Clure,P.R. Israel,D.W. (1979). Transport of nitrogen in the xilem of soybean plantas. Plant Physiol. 64: 411-416.

- 35.-Nguyen,J. (1980).Catabolism of adenine derivatives in leaves.Plant Physiol.66: 935-939.
- 36.-Nguyen,J. and Feierabend,J. (1978). Some properties and subcellular localization of xanthine dehydrogenas in pea leaves. Plant Science Letters.13: 125-132.
- 37.-Nguyen,J. Machal,L. Vidal,J. Rechenmann,P.C. and Gadal. (1986). Immunochemical studies on xanthine dehydrogenase of soybean root nodules: Ontogenic changes in the level of enzyme and immunocytochemical localization. Planta 167: 190-195.
- 38.-Nguyen,J. (1986). Plant xanthine dehydrogenase: its distribution, properties and function Physiol.Veg. 24:(2). 263-281.
- 39.-Newcomb,E.H. and Tandon,S.R. (1981). Uninfected cells of soybean root nodules: Ultrastructure suggests key role in ureide production. Science 212:1394-1396.
- 40.-Rainbird,R.M. Thorne,J.H. and Hardy,W.F.(1984). Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds.Plant Physiol.74: 329-334.
- 41.-Rajagopalan,K.V. and Handler,P. (1967) Purification and properties of chicken liver xanthine dehydrogenase. J. Biol. Chem. 242:(18). 4097-4107.
- 42.-Rao,N.V. Reddy,R.S. and Sastry,K.S. (1988). Allantoinases of nodulated *Arachis hypogaea*. Phytochemistry.27:(3). 693-695.
- 43.-Reynolds,P.H.S. Boland,M.J. Blevins,D.G. Randal,D.D. and chubert,K.R. (1982) Ureide biogenesis in leguminous plants. TIBS (10). 366-368.
- 44.-Schubert,K.R.(1981). Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*.Plant Physiol.68: 1115-1122.
- 45.-Shelp,B.J. Atkins,C.A. Storer,P.J. and Canvin,D.T.(1983) Cellular and subcellular organization of pathways of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of Cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*). Arch.Biochem. and Biophysics 224:(2). 429-441.
- 46.-Silver,A.V. and Gilmore,V. (1969).The metabolism of purines and their derivatives in seedlings of *Pisum sativum*. Phytochem.8:2295-2299.

47.-Stahlhut,R.W. and Widholm,J.M..(1989).Ureide catabolism by soybean [*Glycine max (L) Merril*] cell suspension cultures I. Urea is not an intermediate in allantoin degradation. J.Plant Physiol. 134:85-89.

48.-Stahlhut, R. W. and Widholm J.M. (1989) Ureide catabolism by soybean [*Glycine max (L) Merril*] Cell Suspension Cultures II: Assimilation of Allantoin. J.Plant Physiol.134:90-97.

49.-Seybold, W.D. (1974). Purification and partial characterization of xanthine dehydrogenase from *Drosophila melanogaster*. Biochem.Biophys. Acta.334:266-271.

50.-Stirpe, F. and Corte, D. (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J. Biol. Chem. 244:(14) 3855-3863.

51.-Triplett,E.W.; Blevins,D.G. and Randall,D.D.(1980).Allantoic acid synthesis in soybean root nodule cytosol via Xanthine Dehydrogenase.Plant Physiol.65:pp.1203-1206.

52.-Triplett,E.W., Blevins D.G. and Randall D.D. (1982). Purification and properties of soybean nodule xanthine dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys 219 (1):39-46.

53.-Triplett,E.W. (1985) Intercellular nodule localization and nodule specificity of xanthine dehydrogenase in soybean. Plant Physiol. 77: 1004-1009..

54.-Triplett,E.W.;Lending,C.R.;Gumpf,D.J.and Ware,C.F. (1986). Production, Characterization, and Applications of Monoclonal Antibodies Reactive with soybean nodule Xanthine Dehydrogenase.Plant Physiol.80:965-971.

55.-Triplett,E.W. (1986). Two indirect methods for detecting ureide synthesis by nodulated legumes. Plant Physiol.81:566-571.

56.-Tajima,S.; and Yamamoto,Y.(1975). Enzymes of purine catabolism in soybean plants.Plant and Cell Physiol.16:271-282.

57.-Thomas, R.J. and Schrader, L.E.(1981).Review: Ureide metabolism in higher plants. Phytochem.20: 361-371.

58.-Vance, C.P.and Griffith, S.M. (1989). The molecular biology of N metabolism.Advanced plant biochemistry and molecular biology.1-43 in press.

59.-Vance, C.P., Egli, M.A., Griffith, S.M. and Miller, S.S. (1988). Plant regulated aspects of nodulation and N fixation.Plant Cell Environ. 1-42 in press.

60.-Verma, D.P.S. and Long, S. (1983).The molecular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. Int. Cit. Supl.14:211-245.

61.-Vogels,G.D. and Van Der Drift,C. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms.Bacteriol.Reviews. 403-468.

62.-Webb,M.A.and Newcomb,E.H. (1987) Cellular compartmentation of ureide biogenesis in root nodules of cowpea (*Vigna unguiculata (L) Walp*) Planta 172:162-175.

63.-Woo,K.C. (1981) Ureide synthesis in a cell-free system from cowpea (*Vigna unguiculata (L) Walp.*) nodules.Plant Physiol 67:1156-1160.

64.-Woodward,W.D.;Lee,P.C.;DeLapp,N.W. and Fisher,J.R.(1972) induction of chick liver Xanthine Dehydrogenase by purines. Arch.of Biochem. and Biophys.153:537-542.